

OPTIMIZATION THE GROWTH OF PROTEOLYTIC BACTERIA *Bacillus toyonensis* AT DIFFERENT SALINITY AND CONCENTRATION OF TOFU WASTEWATER

Dewi Asmiati Oktavia¹, Nursyirwani^{1*}, Dessy Yoswaty¹

¹Department of Marine Science, Faculty of Fisheries and Marine, Universitas Riau
Kampus Bina Widya KM. 12,5, Simpang Baru, Kec. Tampan, Kota Pekanbaru, Riau 28293

[*nursyirwani@lecturer.unri.ac.id](mailto:nursyirwani@lecturer.unri.ac.id)

ABSTRACT

Proteolytic bacteria, including *Bacillus toyonensis*, have potential to be used in feed industry and in processing of industrial waste. Cultivation of this bacteria requires appropriate environmental condition and substrate for the growth. The objective of this research was to observe the growth of *B. toyonensis* at different salinity and tofu wastewater concentration. This experimental research used completely randomized design consisted of two factors. Those were salinity (0‰, 15‰, dan 30‰) and different concentrations of tofu wastewater (8%, 10%, and 12%). Bacterial cell growth was observed by the spectrophotometric method and total plate count (TPC) method. The bacterial cell growth was observed at 0, 24, 48, 72 and 96 hours-incubation. The results indicated that the best medium for the growth *B. toyonensis* was in tofu wastewater concentration of 12% at salinity of 15‰. The optimum growth occurred at 48 hours-incubation.

Keywords: Optimization, Proteolytic Bacteria, *Bacillus toyonensis*, Salinity, Tofu Wastewater.

I. PENDAHULUAN

Bakteri proteolitik adalah kelompok bakteri yang mampu memproduksi enzim protease secara ekstraseluler. Enzim tersebut merupakan enzim yang dapat mendegradasi protein yang diproduksi di dalam sel dan dilepaskan keluar sel. *Bacillus* merupakan salah satu genus bakteri proteolitik yang telah banyak digunakan dalam berbagai industri, bioteknologi dan lingkungan.

Dua sifat utama yang membedakan *Bacillus* dari jenis bakteri lain adalah kemampuannya hidup secara aerob (meskipun ada yang bersifat fakultatif anaerob). Dari sifat biokimia, kebanyakan jenis dari *Bacillus* mampu memproduksi enzim katalase [1]. Aktivitas proteolitik bakteri *Bacillus*, sebagaimana *Proteus*, *Pseudomonas* dan *Staphylococcus* dijumpai

pada proses pengomposan [2]. Bakteri proteolitik dapat tumbuh pada kondisi pH antara 2,5 sampai 8,5 dan dapat bertahan pada salinitas 35 ppt [3].

Bacillus mempunyai kemampuan untuk menghasilkan senyawa antibakteri, bakteriosin, dan senyawa kimia antimikroba lainnya seperti *bacitracin*, *pumulin*, *gramicidin*, *laterosporin* dan *tyrocidine*, yang secara efektif menentang bakteri Gram positif, serta *colistin* dan *polymyxin* yang berfungsi untuk melawan bakteri Gram negatif [4].

Bacillus toyonensis merupakan salah satu genus *Bacillus* yang telah dijumpai di berbagai lingkungan seperti dari zona neritik Laut Arabian [5], sedimen laut di Eastern Cape, Afrika Selatan [6], dan pada sedimen laut dalam di Terusan Okinawa Selatan [7]. Jenis bakteri ini juga telah

dijumpai pada sedimen mangrove di Stasiun Kelautan Dumai, Riau [8-9], namun belum diketahui kondisi optimal pertumbuhannya.

Bacillus seperti mikroorganisme lain memerlukan nutrisi atau substrat dan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan. Salah satu sumber substrat yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri adalah limbah cair tahu. Setiap kilogram kedelai akan menghasilkan limbah cair berkisar antara 1,5–2 L. Limbah tahu memiliki kandungan organik yaitu protein yang tinggi (40%-50%), karbohidrat (25%-50%), dan lemak (10%). Oleh karena bahan organik tersebut masih dalam bentuk senyawa kompleks, sehingga sulit untuk didegradasi oleh organisme tanah dan menyebabkan pencemaran air dan tanah. Salah satu upaya yang dilakukan dalam penanganan limbah cair tahu adalah dengan memanfaatkannya sebagai substrat isolasi bakteri proteolitik [10]. [11] menemukan bahwa pertumbuhan *Bacillus* terbaik adalah dengan menggunakan media limbah cair tahu ditambah dengan susu skim.

Dampak positif dari industri tahu adalah dapat meningkatkan perekonomian masyarakat. Namun, industri tahu dapat menimbulkan dampak negatif, dimana limbah cair tahu dapat mengganggu lingkungan, khususnya kualitas dan biota perairan. Untuk mengatasi permasalahan permasalahan tersebut, dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme pengurai seperti bakteri proteolitik.

Salah satu faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri dari lingkungan laut adalah salinitas. Beberapa penelitian terdahulu melaporkan pertumbuhan bakteri pada kisaran 0-20 ppt [12], menunjukkan pertumbuhan lebih baik pada kadar garam 9% daripada 3% [13]. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri proteolitik (*B. toyonensis*) pada konsentrasi limbah cair tahu.

2. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Maret–Mei 2021. Uji optimasi pertumbuhan bakteri adanya pengaruh salinitas dan substrat terhadap pertumbuhan *B. toyonensis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen di laboratorium, yakni mengamati pertumbuhan *B. toyonensis* pada salinitas dan substrat berbeda. Penelitian ini dilaksanakan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dua faktor. Faktor pertama adalah limbah cair tahu dengan konsentrasi berbeda (8%, 10 % dan 12%), dan faktor kedua adalah salinitas berbeda (0‰, 15‰ dan 30‰). Isolat bakteri yang digunakan yaitu *B. toyonensis* strain B.S. SP 1.7 yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya [8]. Sebagai kontrol bakteri ditumbuhkan pada medium TSB pada salinitas 0‰. Ulangan perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Alat

Peralatan yang digunakan seperti tabung reaksi, tabung erlenmeyer dibungkus dengan aluminium foil, sedangkan cawan petri dibungkus dengan kertas padi lalu dimasukkan ke dalam keranjang yang telah disiapkan. Kemudian keranjang dimasukkan kedalam autoklaf untuk disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah dingin dan kering semua peralatan siap digunakan.

Penyiapan Media Kultur

Sebanyak 10 g *nutrient agar* (NA) dilarutkan dalam 500 mL akuades dan dihomogenkan diatas *hot plate* dengan *stirrer*, lalu medium NA disterilisasi pada

suhu 121°C selama 15 menit. Setelah agak dingin sebanyak 15-20 mL media NA dituangkan ke dalam cawan petri steril.

Penyediaan Biakan Murni

Biakan murni *B. toyonensis* berasal dari stok laboratorium mikrobiologi laut Universitas Riau dibuat sub kultur pada media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Biakan ini nantinya dijadikan sebagai stok kultur dan disimpan dalam lemari pendingin.

Penyediaan Larutan McFarland

Pembuatan larutan McFarland bertujuan untuk penyetaraan jumlah bakteri yang akan digunakan pada media uji pertumbuhan. Larutan McFarland dibuat dengan menggunakan larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1% di dalam tabung reaksi, ditutup dengan aluminium foil, divorteks dan disimpan pada suhu ruang [14]. Suspensi bakteri yang digunakan pada penelitian ini, yaitu 1 McFarland yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL [15].

Penyiapan Media Uji Pertumbuhan

Media yang digunakan limbah cair tahu yang didapatkan di pabrik industri rumah tangga pembuatan tahu yang berada di Suka Karya, Kecamatan Tampan Kota Pekanbaru. Media kultur bakteri disiapkan dengan volume total masing-masing perlakuan sebanyak 100 mL. Pada perlakuan pertama (A1B1) pada erlenmeyer dimasukkan limbah cair tahu sebanyak 8 mL lalu ditambah akuades (salinitas 0‰) sebanyak 82 mL. Untuk perlakuan kedua (A1B2) sebanyak 8 mL limbah cair tahu ditambah air bersalinitas 15‰ sebanyak 82 mL. Untuk perlakuan ketiga (A1B3) sebanyak 8 mL limbah cair tahu ditambah air bersalinitas 30 ‰. Prosedur yang sama dilakukan untuk menyiapkan perlakuan keempat (A2B1) sampai perlakuan kesembilan (A3B3). Semua media yang telah disiapkan, kecuali susu skim, disterilisasi pada suhu 121°C selama 15

menit. Setelah dingin ke dalam tiap wadah kultur ditambahkan 10 mL larutan susu skim. Larutan susu skim dibuat dengan melarutkan 10 g susu skim di dalam 90 mL akuades, lalu dipasteurisasi pada suhu 67°C selama 30 menit di dalam *waterbath shaker*. Kultur bakteri dengan media pertumbuhan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C di dalam *waterbath shaker* dan penghitungan jumlah sel bakteri dilakukan pada waktu 0, 24, 48, 72 dan 96 jam.

Kultur Bakteri pada Media Pertumbuhan

Isolat bakteri *B. toyonensis* strain B.S. SP 1.7 diambil dari media NA dengan menggunakan jarum ose, lalu disuspensikan ke dalam 10 mL larutan fisiologis 0,9% NaCl secara aseptis dan dihomogenkan menggunakan *vortex* sampai kekeruhan suspensi bakteri setara dengan larutan standar 0,5 McFarland. Kemudian sebanyak 10 mL suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam media uji pertumbuhan yang telah disiapkan. Semua wadah kultur tersebut diletakkan di atas *Waterbath shaker* pada suhu 37°C dengan kecepatan 90 rpm selama 24 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan pada jam ke-24, 48, 72 dan 97.

Perhitungan Jumlah Bakteri

Jumlah bakteri pada masing-masing perlakuan dihitung dengan dua metode, yaitu secara spektrofotometri dan dengan hitungan cawan (*Total Plate Count*, TPC).

Metode Spektrofotometri

Metode ini berdasarkan pengukuran kekeruhan karena pertumbuhan bakteri dengan menggunakan. Sampel bakteri pada masing-masing media uji di ambil dan dimasukkan ke dalam kuvet. Kemudian kuvet diletakkan di dalam spektrofotometer dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 630 nm. Prosedur ini mengikuti prosedur yang dilakukan oleh

[16] yang mengukur pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 630 nm. Nilai absorbansi kemudian dikonversikan ke dalam rumus regresi linear yang telah didapat dari data kurva standar McFarland untuk mendapatkan kepadatan sel pada media pertumbuhan.

Metode Total Plate Count (TPC)

Langkah pertama dalam metode ini yaitu menyiapkan media PCA (*Plate Count Agar*). Sampel bakteri pada masing-masing media pertumbuhan diambil sebanyak 1 mL, lalu diencerkan di dalam larutan garam fisiologis (0,9 %) sampai pengenceran 10^{-5} . Sebanyak 0,1 mL dari tiap pengenceran diambil dan diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media PCA. Setelah rata, semua cawan petri diinkubasi selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA dihitung menggunakan *colony counter*. Jumlah koloni yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam rumus perhitungan bakteri [17], yaitu:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{\text{Jumlah Koloni}}{\text{Volume sampel} \times \text{Faktor Pengenceran}}$$

Analisis Data

Data jumlah bakteri pada perlakuan salinitas dan substrat (limbah cair tahu) disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Kemudian data dijelaskan secara deskriptif. Untuk melihat adanya perbedaan antar perlakuan, dilakukan uji statistik (ANOVA), apabila terdapat perbedaan yang nyata pada tingkat kepercayaan 95%, maka akan dilanjutkan dengan uji beda nyata (Newman-Keuls). Deskripsi hasil diperoleh didukung dengan referensi penelitian terkait

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan Sel Bakteri *B.toyonensis*

Pertumbuhan dan jumlah bakteri *B.toyonensis* strain B.S SP 1.7 dengan metode spektrofotometri diperoleh dari

nilai absorbansi dan setelah dikonversikan dengan nilai absorbansi kurva standar dari larutan McFarland, dengan persamaan regresi $Y = -0,8524 + 25,696x$. Rata-rata kepadatan sel bakteri pada media uji pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-Rata Kepadatan Sel Bakteri *B.toyonensis* Metode Spektrofotometri

Media (%)	Waktu Pengukuran (Jam ke-)				
	($\times 10^8$ CFU's/mL)				
	0	24	48	72	96
A1B1	1,746	1,752	1,726	1,717	1,708
A1B2	1,762	1,765	1,750	1,723	1,717
A1B3	1,759	1,766	1,745	1,733	1,730
A2B1	1,739	1,777	1,777	1,751	1,731
A2B2	1,756	1,777	1,745	1,727	1,717
A2B3	1,778	1,783	1,764	1,714	1,675
A3B1	1,796	1,799	1,797	1,793	1,792
A3B2	1,790	1,798	1,793	1,779	1,763
A3B3	1,797	1,811	1,816	1,814	1,808
K (+)	0,725	0,949	1,029	1,142	1,123

Keterangan:

A1B1: Media+limbah tahu 8% salinitas 0‰
 A1B2: Media+limbah tahu 8% salinitas 15‰
 A1B3: Media+ limbah tahu 8% salinitas 30‰
 A2B1: Media+limbah tahu 10% salinitas 0‰
 A2B2: Media+limbah tahu 10% salinitas 15‰
 A2B3: Media+limbah tahu 10% salinitas 30‰
 A3B1: Media+limbah tahu 12% salinitas 0‰
 A3B2: Media+limbah tahu 12% salinitas 15‰
 A3B3: Media+limbah tahu 12% salinitas 30‰
 Kontrol (+): TSB salinitas 0‰.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan jumlah sel bakteri pada semua perlakuan. Pertumbuhan bakteri optimum terjadi pada jam ke-24, kecuali pada perlakuan A3B3 yang terjadi pada jam ke-48 dan perlakuan kontrol terjadi pada jam ke-72. Pada penelitian ini diketahui bahwa penambahan limbah cair tahu 12% pada salinitas 30‰ (perlakuan A3B3) menunjukkan penambahan jumlah bakteri tertinggi ($1,816 \times 10^8$ CFU's/mL).

Hasil penemuan tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi limbah cair tahu pada media kultur bakteri menyebabkan semakin tinggi kandungan nutrisi yang tersedia bagi

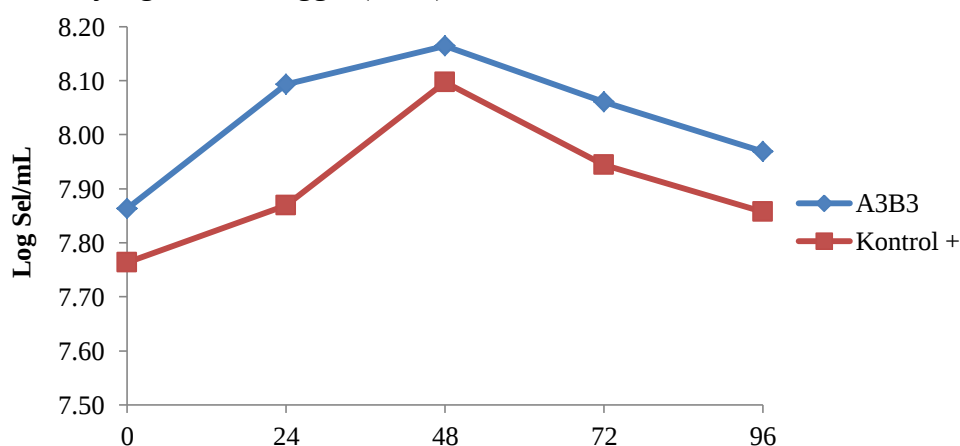
pertumbuhan bakteri [18]. Selain itu, penambahan susu skim sebagai sumber nutrisi terutama protein juga mempengaruhi pertumbuhan sel secara cepat. Menurut [19] penambahan konsentrasi susu skim dan maltodekstrin yang semakin tinggi dapat meningkatkan viskositas suatu cairan. Semakin tinggi viskositas maka lapisan yang mengelilingi bahan inti sel bakteri akan terbentuk lebih cepat, sehingga bahan inti segera terlindungi.

Sumber mikronutrien yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan seperti Vitamin B12, KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 . Hasil penelitian [20], menunjukkan terjadi efek peningkatan kepadatan sel pada awal waktu kultivasi karena penambahan sumber P dalam bentuk KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 , efek yang terjadi pada penambahan garam posfat ini terjadi melalui mekanisme *buffering* yaitu pengendalian nilai pH.

Salinitas optimal untuk pertumbuhan bakteri pada penelitian ini adalah 15‰. Pada salinitas yang lebih tinggi (30‰)

menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel bakteri. Hal ini disebabkan karena peningkatan kadar NaCl berefek negatif pada pertumbuhan sel bakteri karena terjadinya gangguan pada membran sel mikroba [21]. Di samping itu, salinitas tinggi menyebabkan konsentrasi ion eksternal meningkat. Untuk mencapai kesetimbangan, ion akan memasuki sel dan air akan keluar dari sel. Pada kasus yang lebih parah, membran sel, organel intraseluler, dan enzim akan rusak. Sedangkan pada salinitas menurun, untuk mencapai keseimbangan ion, air akan masuk dalam sel untuk mengurangi konsentrasi ion, jika air masuk terlalu banyak sel akan rusak [22].

Pola pertumbuhan bakteri pada media dengan konsentrasi limbah cair tahu 12% dan pada salinitas 30‰, dibandingkan dengan pertumbuhan pada media TSB sebagai kontrol dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik pertumbuhan optimum *B. toyonensis* pada medium limbah cair tahu 12% salinitas 30‰ (A3B3) dan medium TSB.

Gambar 1 terlihat bahwa pertumbuhan optimum *B. toyonensis* pada media A3B3 dengan konsentrasi limbah cair tahu 12% dan salinitas 30‰ lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif (media TSB). Data ini membuktikan bahwa limbah cair tahu 12% dapat digunakan

sebagai pengganti media untuk menumbuhkan bakteri.

Jumlah Total Plate Count (TPC) Sel *B. toyonensis*

Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel bakteri *B. toyonensis* dengan metode *total plate count* (TPC) disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah TPC *B. toyonensis* pada Salinitas dan Limbah Cair Tahu Berbeda

Media (%)	Waktu Pengukuran (Jam ke-) ($\times 10^8$ CFU's/mL)				
	0	24	48	72	96
A1B1	0,40	0,65	0,88	0,74	0,57
A1B2	0,43	0,61	0,99	0,89	0,65
A1B3	0,37	0,65	0,94	0,80	0,61
A2B1	0,46	0,62	1,03	0,62	0,47
A2B2	0,47	0,61	0,97	0,80	0,66
A2B3	0,32	0,80	0,95	0,89	0,73
A3B1	0,34	0,57	1,01	0,82	0,61
A3B2	0,47	0,74	0,86	0,78	0,58
A3B3	0,73	1,24	1,46	1,15	0,93
K (+)	0,58	0,74	1,25	0,88	0,72

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa peningkatan jumlah total sel bakteri *B. toyonensis* juga terjadi seiring dengan meningkatnya konsentrasi limbah cair tahu sebagai substrat pertumbuhan. Pertambahan jumlah sel bakteri pada semua perlakuan terjadi pada jam ke-48. Pertumbuhan bakteri optimum terlihat pada perlakuan A3B3 yaitu pemberian konsentrasi limbah cair tahu 12% dan salinitas 30‰ ($1,46 \times 10^8$ CFU's/mL). Kemudian jumlah bakteri pada semua perlakuan menurun sampai waktu pengamatan 96 jam.

Pertumbuhan bakteri *B. toyonensis* pada perlakuan A3B3 juga melebihi pertumbuhan bakteri pada medium TSB sebagai kontrol positif. Hasil penelitian ini

sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh [11], dimana pertumbuhan terbaik dijumpai pada bakteri konsorsium yang dikultur pada limbah cair tahu konsentrasi 12%.

Pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi limbah cair tahu dan salinitas berbeda meningkat menurut substrat dan menurun pada salinitas yang tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat [23], menjelaskan bahwa kompleks enzim dan substrat dapat diperoleh melalui adanya kontak antara enzim dengan ketersediaan substrat pada sisi aktif enzim. Jika konsentrasi substrat rendah maka aktivitas enzim yang dihasilkan juga rendah, sedangkan jika konsentrasi substrat ditingkatkan, maka hasil dari aktivitas enzim pun meningkat. Namun pada batas konsentrasi substrat tertentu, seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat maka aktivitas enzim pun dapat menurun.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil ini didapatkan bahwa *B. toyonensis* dapat tumbuh pada medium limbah cair tahu pada salinitas berbeda. Pertumbuhan optimum bakteri terjadi pada medium limbah cair tahu 12% dan salinitas 15‰ pada jam ke- 48.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan *B. toyonensis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Doi, R.H., M. Mcgloughlin. (1992). *Biology of Bacilli: Applications to Industry*. Butterworth-Hcinemann, Boston, London, Oxford, Singapore, Sydney Toronto, Wellington: 370 Pp.
- Puspitasari, F.D., M. Shovitri, N.D. Kuswytasari. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1: 1-4.
- Marlida, R., M.A. Suprayudi, Widanarni, E. Harris. (2014). Isolation, Selection and Application of Probiotic Bacteria for Improvement the Growth Performance of Humpback Groupers (*Cromileptes altivelis*). *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 16 (1): 364-379
- Feliatra., I. Lukistyowati., N. Nursyirwani., D. Melina, M. Ramadhani. (2018). Comparative Study Between Probiotics Isolated from Giant Freshwater Prawns and Giant Tiger Prawns in Improving the Health of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 216 (012009): 1-8

5. Tallur, P.N., D.B. Sajjan, S.I. Mulla, M.P. Talwar, A. Pragasam, V.M. Nayak. (2016). Characterization of antibiotic resistant and enzyme producing bacterial strains isolated from the Arabian Sea. *Biotech.* 6 (1): 28. doi: 10.1007/s13205-015-0332-3
6. Okaiyeto, K., U.U. Nwodo, L.V. Mabinya, A.I. Okoh. (2015). *Bacillus toyonensis* Strain AEMREG6, a Bacterium Isolated from South African Marine Environment Sediment Samples Produces a Glycoprotein Biofloculant. *Molecules* 20 (3): 5239–5259.
7. Luo, J.C., Hao, L., Jian, Z., Zhao, Y., Sun, L. (2021). Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology* 11. Article 629116. <https://10.3389/fcimb.2021.629116>
8. Nursyirwani, N., F. Feliatra, A. Tanjung, F. Harjuni. (2020). Isolation of cellulolytic bacteria from mangrove sediment in Dumai marine station riau and the antibacterial activity against pathogens. The 8th International and National Seminar on Fisheries and Marine Science. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 430 (2020) 012012. doi:10.1088/1755-1315/430/1/012012.
9. Nursyirwani, N., J. Samiaji, A. Tanjung, I. Effendi, K.M. Claudia. (2021). Growth and Enzyme Production of Proteolytic Bacteria from Mangrove Sediment. The 9th International and National Seminar on Fisheries and Marine Science. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 695 (2021) 012044. doi:10.1088/1755-1315/695/1/012044.
10. Asril, M., I. Oktaviani, S.S. Leksikowati. (2019). Isolasi Bakteri Indigineous dari Limbah Cair Tahu dalam Mendegradasi Protein dan Melarutkan Fosfat. *Jurnal Teknologi Lingkungan* 20(1): 67-72.
11. Nasution, M.N., Feliatra, I. Effendi. (2021). Growth Analysis of Single Cell Protein (PST) Bacteria *Bacillus cereus* using Different Media. *Jurnal Perikanan dan Kealutan*, 26(1): 47-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.31258/jpk.26.1.47-53>
12. Arisandi, A., M.K. Wardani, K. Badami, G.D. Araninda. (2017). Dampak perbedaan salinitas terhadap viabilitas bakteri *Vibrio fluvialis*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 9(2): 91-97
13. Wijanarka, Sudarno, N.A. Pratama. (2017). Pertumbuhan bakteri anaerobic ammonia oxidation (anammox) pada salinitas 2 dan 9 persen. *Jurnal Biologi Papua* 9(2): 55-62.
14. Haris, A., Arniati, S. Werorilangi. (2013). Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode *High Troughput Screening* (HTS) dengan Indikator MTT (3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). *Jurusan Ilmu Kelautan, FIKP, UNHAS*: 1 – 14
15. Rizky, W.D. (2013). Pengaruh Kandungan Protein Tepung Bulu Ayam sebagai Media Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Skripsi. Poltekkes Kemenkes Semarang*.
16. Imron, M.F., I.F. Purwanti. (2016). Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* untuk Menyisihkan *Trivalent Chromium* (Cr³⁺) pada Limbah Cair. *Jurnal Teknik ITS* 5(1)
17. Tyas, D.E., N. Widyorini, A. Solichin. (2018). Perbedaan Jumlah Bakteri dalam Sedimen pada Kawasan Bermangrove dan Tidak Bermangrove di Perairan Desa Bedono, Demak. *Journal of Maquares* 7(2): 189-196.
18. Lizayana., Mudatsir, Iswadi. (2016). Densitas Bakteri pada Limbah Cair Pasar Tradisional. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi* 1(1): 95-106.
19. Triyono, A. (2010). Mempelajari Pengaruh Maltodekstrin dan Susu Skim terhadap Karakteristik Yoghurt Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus L.*). *Seminar Rekayasa Kimia*

- dan Proses, Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang
20. Hidayati, A.D. (2017). Pengaruh Hasil Reformulasi dengan Penambahan KH_2PO_4 dan NH_4Cl pada MHB (*Mycorrhiza Helper Bacteria*) dan *Glomus* spp. Terhadap Populasi *Pratylenchus Coffeae* dan Pertumbuhan Bibit Kopi serta Pemanfaatannya Sebagai Buku Nonteks. Skripsi. Universitas Jember.
 21. Gardini, F., M. Martuscelli., M. C. Caruso., F. Galgano., M. A. Crudele., F. Favati., M. E. Guerzoni, G. Suzzi. (2001). Effects of pH, Temperature and NaCl Concentration on the Growth Kinetics, Proteolytic Activity and Biogenic Amine Production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microb.* 64,105-117
 22. Lobban, C.S., P.J. Harrison. (1987). *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press.
 23. Poedjiadi, A., T.F.M. Supriyanti. (2006). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.